

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
6 décembre 2001 (06.12.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/92533 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/31, C07K 14/335, A23L 3/3463, 3/3571

Laurence [FR/FR]; 10, rue Laurent Brisson, F-86370
Vivonne (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/01642

(74) Mandataires : JACOBSON, Claude etc.; Cabinet
Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex
09 (FR).

(22) Date de dépôt international : 28 mai 2001 (28.05.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/06859 29 mai 2000 (29.05.2000) FR
00/13407 19 octobre 2000 (19.10.2000) FR

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : RIIO-
DIA CHIMIE [FR/FR]; 26 Quai Alphonse le Gallo,
F-92512 Boulogne Billancourt (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BERJEAUD, Jean-Marc [FR/FR]; 83, Impasse de
la Touche, F-86800 Savigny l'Evescault (FR). FRE-
MAUX, Christophe [FR/FR]; 19, rue des Jones, F-86600
Poitiers (FR). CENATIEMPO, Yves [FR/FR]; 26, rue
de Beaulieu, F-86800 Saint Julien l'Ars (FR). SIMON,

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

WO 01/92533 A1

(54) Title: ANTI-LISTERIA BACTERIOCIN

(54) Titre : BACTERIOCINE ANTI-LISTERIA

(57) Abstract: The invention concerns an isolated polypeptide which is a bacteriocin called Sakacine G derived from *Lactobacillus sakei* 2512. The invention also concerns a nucleic acid coding for said bacteriocin and the use of said polypeptide as active agent against pathogenic and undesirable flora in the preparation of food products.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un polypeptide isolé qui est une bactériocine dénommée Sakacine G issue de *Lactobacillus sakei* 2512. Elle a également pour objet un acide nucléique codant pour ladite bactériocine et vise l'utilisation dudit polypeptide comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables dans la préparation de produits alimentaires.

BACTERIOCINE ANTI-LISTERIA

La présente invention concerne une bactériocine de *Lactobacillus sakei* et plus particulièrement de *Lactobacillus sakei* 2512, une séquence nucléotidique codant pour cette bactériocine, et l'utilisation industrielle de cette bactériocine
5 comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables dans la préparation de produits alimentaires.

Les bactéries lactiques sont utilisées intensivement dans les fermentations alimentaires afin, non seulement d'améliorer la saveur et la texture des aliments mais surtout pour allonger leur durée de conservation. De nombreuses bactéries lactiques
10 ont en effet la faculté d'inhiber la croissance de certaines bactéries à Gram positif, dont des souches pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, grâce à l'excrétion de molécules antagonistes, parmi lesquelles des composés peptidiques. Ces composés peptidiques, appelés bactériocines, présentent donc un potentiel intéressant pour la préservation qualitative et sanitaire de produits alimentaires fermentés.

A titre représentatif de ces bactériocines, on peut notamment citer celles formant la sous-classe de polypeptides dénommés bactériocines anti-*Listeria*, bactériocines de classe IIa (Ennahar S. *et al.*, 2000, FEMS Microbiol. Rev., 24 :85-106) et cystibiotiques (Jack R. *et al.*, 1995, Microbiol. Rev., 59(2) :171-200). Il a été fait récemment état de l'utilisation potentielle d'une de ces bactériocines de classe IIa,
15 la divercine V41, pour empêcher la croissance de *Listeria monocytogenes* dans du saumon fumé (Duffes F. *et al.*, 1999, J. Food Prot., 62(12) :1394-1403).

Les séquences de ces polypeptides présentent de fortes similitudes dans leur partie N-terminale, avec en particulier la présence d'un pont disulfure. La partie C-terminale hydrophobe est beaucoup plus variable, toutefois certaines de ces
25 bactériocines, dites de type pédiocine (pédiocine PA-1, entéroïne A et divercine V41), se caractérisent par une taille supérieure à 40 résidus et la présence d'un deuxième pont disulfure du côté C-terminal.

Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence une nouvelle bactériocine de classe IIa produite à partir d'une souche spécifique de *Lactobacillus*

sakei, qui s'avère particulièrement efficace pour inhiber la croissance de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*.

En accord avec Tagg J.R. *et al.*, Bacteriol. Rev., 40 ; 722-756 (1976), le terme "Bactériocine" au sens de l'invention fait référence à un polypeptide produit, par synthèse ribosomique, à partir de microorganismes, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres bactéries.

La présente invention a donc pour premier objet un polypeptide issu de la souche *Lactobacillus sakei* 2512, doté d'une activité bactériocine.

La souche *Lactobacillus sakei* 2512 a été déposée le 25 mai 2000 auprès de la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes où elle est enregistrée sous le numéro de dépôt I - 2479.

La bactériocine objet de la présente invention a été dénommée Sakacine G. Il s'agit d'un polypeptide possédant une masse moléculaire de l'ordre de 3700 à 3900 et préférentiellement d'environ 3834 Da déterminée par spectrométrie de masse. Elle possède un spectre d'inhibition bactérienne très apparenté à celui des bactériocines de classe IIa. C'est ainsi qu'elle s'avère particulièrement efficace contre les souches de *Lactobacillus sakei* autres que le *Lactobacillus sakei* 2512, *Pediococcus cerevisiae*, l'ensemble des souches *Listeria* et contre les *Enterococcus faecalis* et *durans*. En revanche, elle s'avère inactive contre les autres espèces de *Lactobacillus* comme par exemple le *Lactobacillus debrueckii*, le *Lactobacillus plantarum*, le *Lactobacillus brevis*, le *Lactobacillus casei*, et une souche d'*Enterococcus faecium*.

A l'image des bactériocines anti-*Listeria* de type pédiocine, la Sakacine G possède dans sa structure peptidique avantageusement deux ponts disulfures.

Une analyse des déterminants génétiques de plusieurs bactériocines de classe IIa a montré que les gènes impliqués dans leurs production, transport et immunité, sont organisés en une ou plusieurs structures de type opéron. Ces opérons ont une localisation souvent plasmidique et possèdent généralement au moins deux gènes codant pour des protéines, homologues à un ABC-transporteur et une protéine accessoire, probablement impliquée dans l'export des bactériocines.

Le clonage du fragment nucléotidique contenant le gène de la Sakacine G a révélé l'existence de trois cadres ouverts de lecture complets *skgA1* (SEQ ID N°1), *skgA2* (SEQ ID N°3) et *skgDc* (SEQ ID N°13) (incluant le cadre de lecture tronqué *skgD* (SEQ ID N°7)) et d'un cadre tronqué *skgI* (SEQ ID N°5) dont une
5 représentation schématique est présentée en figure 1. Le fragment nucléotidique est un double brin dont le monobrin 5'-3' est représenté en séquence ID N°15.

Les produits des gènes *skgA1* et *skgA2*, appelés pré-bactériocines, peuvent subir une maturation au cours de laquelle leurs peptides leaders respectifs sont clivés entre les résidus 18 et 19, libérant ainsi la Sakacine G active (résidus 19-55).

10 Le fragment nucléotidique monobrin 5'-3' comprenant *skgA1*, *skgA2*, *skgD* et *skgI* figure en SEQ ID N°9.

La présente invention a donc également pour objet un polypeptide isolé correspondant à une bactériocine, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°2 et/ou la séquence ID N°4. La séquence de la bactériocine mature correspond à la
15 séquence ID N°12 et est comprise dans les séquences ID N°2 et ID N°4.

Le cadre de lecture appelé *skgI* code une protéine de 52 résidus. La comparaison de cette séquence avec celle des banques de données montre de fortes similitudes de SkgI avec des protéines dites d'immunité. Elle code vraisemblablement la protéine d'immunité protégeant la bactérie productrice de la
20 Sakacine G.

La présente invention s'étend également à un polypeptide isolé comprenant la séquence ID N°6 correspondant au cadre de lecture *skgI*.

En ce qui concerne le dernier gène *skgDc*, il code une protéine qui présente une homologie avec des protéines de la famille des ABC-transporteurs, et plus
25 particulièrement du transporteur de la pédiocine PA-1. Le gène *skgDc* code vraisemblablement l'ABC-transporteur spécifique de la Sakacine G.

La présente invention s'étend également au polypeptide isolé comprenant la séquence ID N°8 correspondant au gène dit *skgD* et au polypeptide isolé comprenant la séquence ID N°14 correspondant au gène dit *skgDc*.

30 Il est entendu que sont également comprises les séquences homologues, définies comme

i) les séquences similaires à au moins 70% de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N° 6, N° 8, N° 12, ou N° 14 ; ou

ii) les séquences codées par une séquence d'acide nucléique homologue telle que définie ci-après c'est-à-dire une séquence d'acide nucléique hybridant avec la séquence SEQ ID N° 1, N° 3, N° 5, N° 7, N° 9, N° 13 ou N° 15 ou sa séquence complémentaire, dans des conditions stringentes d'hybridation.

Là encore, le terme "similaires" se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les acides aminés des séquences homologues comparées mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de similitudes dans une séquence polypeptidique prend en compte les substitutions conservatives qui sont des substitutions d'acides aminés de même classe, telles que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la serine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique); d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

Plus généralement, par "séquence d'acides aminés homologue", on entend donc toute séquence d'acides aminés qui diffère de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N° 6, N° 8, N° 12 ou N° 14 par substitution, délétion et/ou insertion d'un acide aminé ou d'un nombre réduit d'acides aminés, notamment par substitution d'acides aminés naturels par des acides aminés non naturels ou pseudo-acides aminés à des positions telles que ces modifications ne portent pas significativement atteinte à l'activité biologique du polypeptide isolé et de préférence de la Sakacine G.

De préférence, une telle séquence d'acides aminés homologue est similaire à au moins 85 % de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N° 6, N° 8, N° 12 ou N° 14, de préférence au moins 95 %.

L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University

Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés similaires sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité ou similitude, comme défini plus haut). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces ("gaps") dans la séquence. Une fois l'alignement optimal
5 réalisé, le degré d'homologie est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

L'activité biologique du polypeptide isolé et notamment de la Sakacine G se réfère à sa capacité à inhiber la croissance de souches bactériennes indésirables et/ou
10 pathogènes, de préférence de bactéries *Listeria* et plus particulièrement de bactéries *Listeria monocytogenes*.

La présente invention a également pour objet un acide nucléique isolé, codant pour un polypeptide tel que défini précédemment.

15 Plus précisément, la présente invention a pour objet un acide nucléique isolé comprenant la séquence ID N°1 et/ou la séquence ID N°3.

La séquence nucléotidique complète de la région impliquée dans l'expression de la Sakacine G (3055 pb) a été déterminée. Il s'agit d'un ADN double brin dont le brin 5'-3' est représenté en séquence ID N°15. Le brin 3'-5' est présenté
20 en figure 2. La présente invention vise également un acide nucléique comprenant une telle séquence.

Comme décrit précédemment, cette séquence possède trois cadres ouverts de lecture complets *skgA1*, *skgA2* et *skgDc* et un tronqué, *skgI*. Les gènes supposés *skgA1* (SEQ ID N°1), *skgA2* (SEQ ID N°3) et *skgI* (SEQ ID N°5) y sont orientés en
25 sens inverse par rapport à *skgDc* (SEQ ID N°13).

Sont également revendiqués dans le cadre de la présente invention, l'acide nucléique comprenant la séquence ID N°5, l'acide nucléique comprenant la séquence ID N°13 et l'acide nucléique comprenant la séquence ID N°7.

Il est entendu que sont également comprises les séquences homologues,
30 définies comme :

i) des séquences similaires à au moins 70 % de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 ou N°15 ; ou

ii) des séquences hybridant avec la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 ou N°15 ou leur séquence complémentaire, dans des conditions
5 stringentes d'hybridation, ou

iii) des séquences codant pour le polypeptide dénommé Sakacine G, tel que défini précédemment.

De préférence, une séquence nucléotidique homologue selon l'invention est similaire à au moins 75 % des séquences SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 ou
10 N°15, de préférence encore au moins 85 %, ou au moins 90 %.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue hybride spécifiquement aux séquences complémentaires de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 ou N°15 dans des conditions stringentes. Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50%
15 des brins appariés se séparent (T_m).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, T_m est définie par la relation (Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory) :

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentration en cations}) - 0,63(\%\text{formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$$

20 Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T_m est définie par la relation :

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T).$$

Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation peut être de préférence de
25 5 à 10°C en dessous de T_m , et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de force ionique élevée telle qu'une solution 6xSSC par exemple.

Le terme "séquences similaires" employé plus haut se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les nucléotides comparés mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de
30 similitudes dans les séquences nucléiques distingue par exemple les purines et les pyrimidines.

Une séquence nucléotidique homologue aux cadres ouverts de lecture représentés en SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 ou N°15 inclut donc toute séquence nucléotidique qui diffère de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 ou N°15 par mutation, insertion, délétion ou substitution d'une ou plusieurs
5 bases, ou par la dégénérescence du code génétique, pour autant qu'elle code un polypeptide présentant l'activité biologique de la Sakacine G, comme définie ci-après.

Parmi de telles séquences homologues, sont comprises les séquences des gènes de bactéries autres que *Lactobacillus*, codant pour la Sakacine G.

10 Les polypeptides de la présente invention peuvent être synthétisés par toutes les méthodes bien connues de l'homme du métier. Les polypeptides de l'invention peuvent par exemple être synthétisés par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires non désirés et
15 pour sa facilité de production.

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'un polypeptide recombinant dans lequel un vecteur comprenant un acide nucléique conforme à la présente invention est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide conforme à la
20 présente invention ou d'un polypeptide codé par une séquence d'acide nucléique conforme à la présente invention.

La bactériocine recombinante peut également être produite par un procédé, dans lequel un vecteur contenant un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique conforme à l'invention et de préférence les séquences SEQ ID N°1
25 et/ou N°3 où une séquence homologue est transférée dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression du polypeptide correspondant. La protéine produite peut ensuite être récupérée et purifiée. Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant obtenu peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du
30 surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les

techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux spécifiques, etc.

La séquence d'acide nucléique d'intérêt, codant pour la Sakacine G, peut être insérée dans un vecteur d'expression, dans lequel elle est liée de manière opérante à des éléments permettant la régulation de son expression, tels que notamment des promoteurs, activateurs et/ou terminateurs de transcription. Les signaux contrôlant l'expression des séquences nucléotidiques (promoteurs, activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation ou la précipitation au phosphate de calcium.

Les vecteurs de clonage et/ou d'expression tels que décrits ci-dessus, contenant une séquence nucléotidique définie selon l'invention font également partie de la présente invention.

L'invention vise en outre les cellules hôtes transformées, de manière transitoire ou stable, par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes, de préférence procaryotes, d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transférée.

Des exemples de cellules hôtes incluent notamment des bactéries telles que *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Escherichia* et les levures.

Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base des séquences SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 et/ou N°15. De telles banques

peuvent être préparées par des techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la
5 modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

La présente invention se rapporte également à un procédé pour inhiber la croissance de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes* dans un
10 environnement qui peut être alimentaire ou non et qui est susceptible d'être contaminé avec les *Listeria monocytogenes*.

Les *Listeria monocytogenes* sont des microorganismes pathogènes qui sont à l'origine de sévères maladies chez les êtres humains et animaux et qui peuvent notamment être facilement transmissibles par des aliments contaminés, plus
15 spécialement au moyen de viandes, de produits carnés, de produits marins, de lait et de produits dérivés. La présente invention propose donc un procédé pour inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes* dans un aliment susceptible de contenir des *Listeria monocytogenes* à titre de contaminant, ledit procédé comprenant l'addition d'un polypeptide conforme à l'invention dans ledit aliment en une quantité suffisante
20 pour inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes*.

Les bactériocines conformes à l'invention sont de préférence utilisées dans tout système alimentaire en une quantité comprise entre 1 et 100000 unités arbitraires (AU) de bactériocines par gramme d'aliment.

Une AU de bactériocines est définie comme 5 µl de la dilution la plus élevée
25 du surnageant de culture conduisant à une zone définie d'inhibition de croissance par rapport à une souche témoin d'une bactérie à Gram positif sur un milieu agar.

Bien que les aliments soient les plus concernés par une contamination par *Listeria monocytogenes*, les produits vétérinaires et médicaux peuvent également être contaminés avec ce type de bactéries, de même que les produits cosmétiques ou
30 produits apparentés.

Les bactériocines conformes à la présente invention, et notamment la Sakacine G, sont donc également utiles pour inhiber la croissance de ce type de pathogènes dans ces produits.

La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation d'une bactériocine
5 conforme à la présente invention comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables notamment dans la préparation de produits alimentaires et plus précisément pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans les produits alimentaires.

Le polypeptide peut être incorporé tel quel dans le produit alimentaire
10 considéré ou encore y être produit à partir de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

La présente invention a ainsi également pour objet l'utilisation de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 dans un produit alimentaire pour y générer un polypeptide bactériocine conforme à l'invention.

L'invention concerne encore une composition bactériocine, caractérisée en
15 ce qu'elle comprend au moins un polypeptide conforme à la présente invention, c'est-à-dire issue de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 ou comprenant la séquence SEQ ID N°2, ou N°4, ou N°12, ou N°14 ou la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

L'invention s'étend également à l'utilisation de la souche *Lactobacillus sakei* 2512 destinée à produire un polypeptide tel que défini plus haut, pour inhiber la
20 croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans des produits alimentaires ainsi que les compositions comportant de telle souche.

Les exemples et la figure ci-après sont présentés à titre illustratif et non
25 limitatif de l'objet de la présente invention.

FIGURE :

Figure 1 : Représentation schématique du locus génétique impliqué dans la production de la sakacine G.

5 Figure 2 : Brin complémentaire 3'-5' correspondant à la séquence nucléotidique complète de la région impliquée dans l'expression de la Sakacine G et dont le brin 5'-3' est présenté en SEQ ID N°15.

MATERIELS ET METHODES

10 • Souches bactériennes et milieux de culture. *Lactobacillus sakei* 2512 est cultivée à 30°C en milieu MRS (DIFCO Laboratories) stérilisé 12 min à 110°C. Les souches indicatrices sont cultivées en milieu BHI ("brain-heart infusion"; DIFCO Laboratories) à 37°C.

15 • Test d'activité. Du milieu BHI, gélosé à 10g/l, estensemencé à 1% par une préculture de souche indicatrice en phase stationnaire avant d'être coulé en boîte de Petri. Cinquante microlitres de solution de sakacine G sont déposés dans des puits creusés dans la gélose refroidie à l'emporte pièce. L'activité bactériocine se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits après incubation une nuit à
20 37°C.

 • Analyse protéique. La sakacine G est analysée en spectrométrie de masse sur un appareil Perkin-Elmer Sciex API 165 équipé d'une source d'ionisation par Ionspray. Après lyophilisation, la fraction HPLC active est reprise avec une solution acétonitrile / eau (1:1) contenant 0,1% d'acide formique puis injectée par infusion à
25 un débit de 5 µl/min.

 La concentration protéique est déterminée par la méthode à l'acide bicinchoninique au moyen du kit BCA (Sigma) selon les instructions du fabricant.

 Les comparaisons de séquences protéiques sont réalisées grâce au programme BLAST (1), accessible à partir du serveur ExPASy du "Swiss Institute of
30 Bioinformatics".

• Clonage moléculaire et transformation. Les plasmides sont extraits et purifiés à partir de souches d'*Escherichia coli* et de *Lactobacillus sakei* 2512 selon les méthodes décrites précédemment par Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory et Muriana et Kjaenhammer, 1987, Appl. Environ. Microbiol.,
5 53 :553-560 respectivement.

Les enzymes de restriction et de modification de l'ADN sont utilisées selon les indications du fournisseur (Gibco-BRL). Les électrophorèses en gel d'agarose, analytique et préparative, sont conduites en tampon Tris/borate/EDTA (pH 8,3) selon les méthodes décrites par Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor
10 Laboratory. Les fragments d'ADN digérés sont purifiés à partir des gels d'agarose en utilisant le kit "Prep-a-Gene" (Bio-Rad). Les clonages dans les plasmides pGEM-T (Promega) et pZERO2 (Invitrogen) sont réalisés selon les recommandations des fournisseurs. Le transfert de type Southern est réalisé sur membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham) selon Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor
15 Laboratory. Le transfert est suivi d'une hybridation avec une sonde radioactive obtenue par marquage au ^{32}P à l'aide du kit "random primers DNA labelling system" (Gibco-BRL). Les bactéries *E. coli* sont rendues compétentes et transformées selon la méthode de Hanahan, 1983. J. Mol. Biol. 166:557-80.

La Taq polymérase (Gibco-BRL) est utilisée selon les recommandations du
20 fournisseur. L'amplification du fragment d'ADN codant la Sakacine G a été réalisée à l'aide d'un appareil "Geneamp 9700®" (Perkin-Elmer) selon les conditions suivantes : 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 45°C pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 1 min suivis d'un cycle supplémentaire d'élongation à 72°C pendant 5 min.

25 Le fragment d'ADN portant le locus sakacine G est séquencé à l'aide d'un séquenceur automatique ABI Prism 310® (Perkin-Elmer) en utilisant le kit de séquençage "Big-dye terminator®" (Perkin-Elmer) et les amorces nucléotidiques appropriées.

30 EXEMPLE 1 :

Isolement et purification de la Sakacine G.

Une culture de 16 h de *Lactobacillus. sakei* 2512 (100 ml) est centrifugée à 6000g pendant 15 min. Le surnageant de culture est ensuite chauffé à 70°C pendant 20 min. Le surnageant refroidi est ensuite dilué avec 1 volume d'eau (le pH de la solution diluée doit être inférieur à 6, par addition d'HCl 1M si nécessaire) avant
5 d'être passé sur une colonne (2.5 x 18 cm) contenant une résine échangeuse de cations (carboxy-méthyl cellulose; Cellufine C-200, Amicon) équilibrée avec de l'eau. Après des lavages successifs avec de l'eau (100 ml) puis une solution de NaCl 0,1M (150 ml), la Sakacine G est éluée avec une solution de NaCl 0,5M (200 ml). Le pH de toutes les solutions doit être inférieur à 6. La fraction active est ensuite
10 déposée sur cartouche d'extraction en phase solide (Sep-pak plus C18, Waters) équilibrée dans l'eau. Après lavages successifs avec 5 ml de solutions d'acétate d'ammonium 20 mM contenant 0, 10, 20 et 30% d'acétonitrile, la Sakacine G est éluée avec 10 ml d'acétate d'ammonium 20 mM contenant 80% d'acétonitrile. Après lyophilisation, l'extrait est solubilisé dans 1 ml de solution aqueuse d'acétonitrile à
15 40% puis injecté sur une colonne HPLC analytique de phase inverse en C8 (Kromasil, 5µm, 100 Å, 4.6 x 250 mm, A.I.T.). L'HPLC a été réalisée sur un appareillage comprenant une pompe Perkin-Elmer series 200 LC connectée à un détecteur Perkin-Elmer 785A. Le chromatogramme en absorption est enregistré à 220 nm. La séparation est réalisée, à un débit de 0,8 ml/min selon le gradient suivant :
20 Solvant A = eau/acide trifluoroacétique 0,1%; solvant B = acétonitrile/eau/ acide trifluoroacétique 0,07%. Après un lavage de 5 min avec 20% de solvant B, l'élution est réalisée par un gradient de 20 de 40% de solvant B en 10 min puis de 40 à 55% de solvant B en 20 min.

La fraction correspondant au pic à 23 min s'étant révélée active contre
25 *Listeria ivanovii* BUG 496 a été analysée en spectrométrie de masse en ionisation "ionspray". La molécule apparaît pure à au moins 95% et possède une masse moléculaire de 3834,32 ± 0,31 Da. La quantité de Sakacine G ainsi purifiée a été estimée à 120 µg à partir de 100 ml de culture. Le rendement de purification a été estimé à 55% d'activité retrouvée. Une partie de la séquence primaire de la Sakacine
30 G a été déterminée par microséquençage et deux oligonucléotides dégénérés ont été établis à partir de cette séquence.

EXEMPLE 2 :

Clonage du locus génétique impliqué dans la production de la sakacine G

Par génétique inverse, deux oligonucléotides dégénérés SakG01 (5'
5 AARTATTATGGNAAAYGGNGT 3') (SEQ ID N°10) et SakG02S (5'
ACATGATGNCCNCCRTTNGC 3') (SEQ ID N°11) ont été choisis afin d'amplifier
le fragment d'ADN correspondant au gène de structure de la sakacine G mature (SEQ
ID N°15) par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). L'amplifiat ainsi obtenu,
d'une taille approximative de 100 pb a été cloné dans le plasmide pGEM-T pour
10 former le plasmide pJMBYC01. Le fragment de restriction *Pvu*III de 560 pb issu de
pJMBYC01, incluant le fragment inséré, a servi de sonde d'hybridation, lors d'un
transfert de type Southern, pour localiser le gène de structure sur le génome de
Lactobacillus sakei 2512. A partir d'un extrait plasmidique de *Lb. sakei* 2512 digéré
par les enzymes de restriction *Hind*III et *Eco*RI, la sonde a révélé des fragments de
15 tailles respectives d'environ 2,1 et 9 kpb. Le fragment *Hind*III de 2,1 kpb a été purifié
puis inséré dans le vecteur pZERO2 pour donner le plasmide pJMBYC02. La
présence du gène de structure de la sakacine G dans pJMBYC02 a été démontrée par
amplification PCR avec les amorces SakG01 et SakG02 puis par séquençage
nucléotidique du fragment inséré dans pJMBYC02. Une stratégie voisine a été
20 utilisée afin de déterminer la séquence complète du gène *skgD*. L'extrait plasmidique
de *Lb. sakei* 2512 a été digéré par *Xba*I. Le produit de digestion a été inséré dans le
plasmide pBluescript SK+. Les clones porteurs de la séquence d'intérêt ont été
révélés au moyen d'une sonde radioactive préparée par PCR réalisée sur le plasmide
pJMBYC02 à l'aide des oligonucléotides SakG03 (5' CCTTGGTCAGGCTATCG
25 3') (SEQ ID N°16) et SakG04 (5' ATCACCTTTTGAATTACCC 3') (SEQ ID
N°17).

L'analyse de la séquence nucléotidique complète de la région (3051 pb) a
révélé l'existence de trois cadres ouverts de lecture complets *skgA1* et *skgA2* et *skgDc*
et d'un tronqué, *skgI*. Les gènes supposés *skgA1* *skgA2* et *skgI* sont orientés en sens
30 inverse par rapport à *skgD*.

Chacun des cadres ouverts de lecture est précédé d'un site potentiel de fixation des ribosomes. Les gènes *skgA1* et *skgA2* codent tous les deux des protéines de 55 résidus d'acides aminés dont les séquences 19-55 sont totalement identiques. La séquence 19-52 correspond à la séquence de la sakacine G obtenue par microséquençage. La présence de 4 résidus cystéine en positions 9, 14 et 24 et C-terminale est à noter. De plus, la masse moléculaire calculée de ce peptide, de 3838,2 Da qui diffère de la masse moléculaire mesurée (3834,32 Da) de 4 Da montre la présence de deux ponts disulfures sur la sakacine G, comme cela a déjà été démontré pour d'autres bactériocines anti-*Listeria*.

10 Les séquences 1-18 des protéines SkgA1 et SkgA2 ne diffèrent que de 3 résidus et présentent de fortes homologues avec les peptides "leader" des bactériocines de classe II, qui sont impliquées dans le transport de ces peptides par des ABC-transporteurs spécifiques. En particulier le motif GG terminal est caractéristique de ces séquences leader et constitue le site de maturation de ces
15 bactériocines. La comparaison des séquences nucléotidiques des gènes *skgA1* et *skgA2* montre également une identité de séquence de plus de 95% pour la partie des gènes codant la bactériocine mature.

Le cadre de lecture ouvert incomplet appelé *skgI* code une protéine de 52 résidus. La comparaison de cette séquence avec celles des banques de données
20 montre de fortes homologues de SkgI avec les protéines dites d'immunité LccI et MesI. L'implication de MesI dans la protection vis à vis de la mésentéricine Y105 a été démontrée. On peut supposer que *skgI* code la protéine d'immunité à la sakacine G.

Le dernier gène *skgDc* code une protéine de 727 acides aminés. D'après les banques
25 de données, SkgDc est très homologue de protéines de la famille des ABC-transporteurs et plus particulièrement des transporteurs de la pédiocine PA-1 : PedD ou PapD (Marugg et al., 1992; Appl Environ Microbiol 58, 2360-7; Motlagh et al., 1994, Lett Appl Microbiol 18, 305-12), de la sakacine P : SppT (Huhne et al., 1996, Microbiology 142, 1437-48), de la sakacine A : SapT (Axelsson and Holck, 1995, J
30 Bacteriol 177, 2125-37) et de la mésentéricine Y105: MesD (Fremaux et al., 1995, Microbiology 141, 1637-45).

EXEMPLE 3 :

Spectre d'inhibition.

La sensibilité à la Sakacine G de 17 souches bactériennes a été testée par la méthode de test en puits (cf Matériels et Méthodes). Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-après :

TABLEAU 1

	Rayon des halos d'inhibition (mm)
<i>Lc. lactis</i> ATCC11454	0
<i>Ln. Paramesenteroides</i> DSM 20288	0
<i>Ln. Mesenteroides</i> DSM 20484	0
<i>Ln. Mesenteroides</i> DSM 20240	0
<i>Lb. Delbrueckii</i> DSM 20081	0
<i>Lb. Plantarum</i> DSM 20174	0
<i>Lb. brevis</i> DSM 20054	0
<i>Lb. casei</i> DSM 20011	0
<i>Lb. sakei</i> 2515	1
<i>P. acidilactici</i> ENSAIA 583	0
<i>P. cerevisiae</i> IP 5492	1
<i>E. faecium</i> ENSAIA 631	0
<i>E. faecalis</i> IP 5430	2
<i>E. faecalis</i> ENSAIA 636	1
<i>E. durans</i> ENSAIA 630	2
<i>L. innocua</i> 8811	3
<i>L. ivanovi</i> BUG 496	6

Le spectre d'inhibition de cette bactériocine apparaît comme assez étroit et limité aux souches de *Lactobacillus sakei* et *Pediococcus cerevisiae* pour les bactéries lactiques. Ce peptide apparaît, comme les autres bactériocines de classe IIa, actif contre toutes les souches de *Listeria* testées, ainsi que contre les *Enterococcus faecalis* et *durans* mais pas contre *Enterococcus faecium*.

REVENDEICATIONS

1. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactériocine, dénommée Sakacine G, issue de *Lactobacillus sakei* 2512.
- 5 2. Polypeptide isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactériocine de classe IIa.
3. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N° 2 et/ou la séquence ID N° 4.
- 10 4. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°12.
5. Acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique codant un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4.
- 15 6. Acide nucléique selon la revendication 5, comprenant la séquence ID N°1 et/ou la séquence ID N°3.
7. Acide nucléique selon la revendication 5 ou 6, comprenant la séquence d'acide nucléique SEQ ID N°15.
- 20 8. Acide nucléique selon la revendication 5 ou 6, comprenant la séquence d'acide nucléique SEQ ID N°9.
9. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°6.
- 25 10. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°8.
11. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°14.
- 30 12. Acide nucléique comprenant la séquence ID N°5.

13. Acide nucléique comprenant la séquence ID N°7.

14. Acide nucléique comprenant la séquence ID N°13.

5

15. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 8, 12 ou 14.

16. Cellule hôte transformée par un vecteur selon la revendication 15.

10

17. Cellule hôte selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un microorganisme choisi parmi les *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Escherichia* ou d'une levure.

15

18. Procédé de production d'un polypeptide recombinant dans lequel un vecteur comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 8 et 12 ou 14 est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture des conditions permettant l'expression d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 et 9 à 11 ou d'un polypeptide codé par une séquence d'acide nucléique telle que définie

20

dans l'une des revendications 5 à 8 et 12 ou 14.

19. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables dans la préparation de produits alimentaires.

25

20. Utilisation selon la revendication 19, caractérisée en ce que ledit polypeptide est mis en œuvre pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans les produits alimentaires.

21. Utilisation selon la revendication 19 ou 20, caractérisée en ce que ledit polypeptide est produit dans le produit alimentaire à partir de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

5 22. Utilisation de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 dans des produits alimentaires pour y produire un polypeptide bactériocine selon l'une des revendications 1 à 4.

10 23. Composition bactériocine caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou la souche de *Lactobacillus Sakei* 2512.

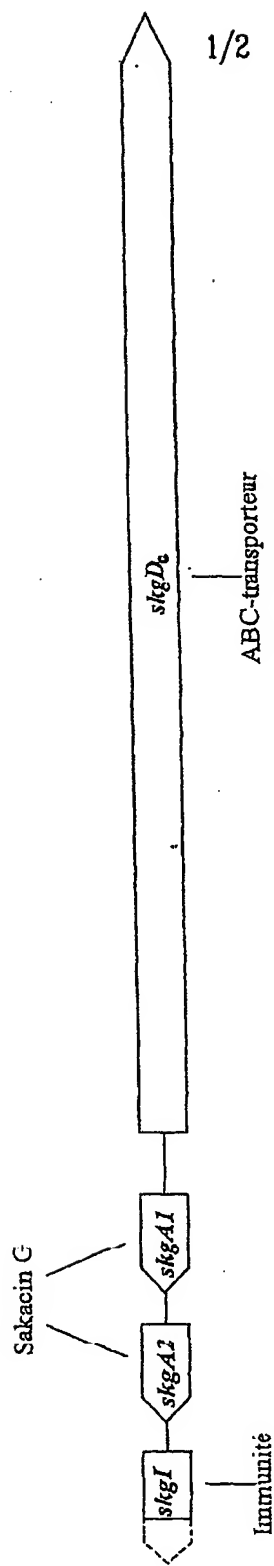


FIG.1

FIG. 2

LISTE DE SEQUENCES

<110> RHODIA CHIMIE

<120> BACTERIOCINE ANTI-LISTERIA

<130>

<140>

<141>

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 196

<212> ADN

<213> Lactobacillus sake

<220>

<221> CDS

<222> (20)..(187)

<400> 1

taa	acaggag	gtattcaaa	atg	aag	aat	aca	cgt	agc	tta	acg	atc	caa	gaa	52
			Met	Iys	Asn	Thr	Arg	Ser	Leu	Thr	Ile	Gln	Glu	
			1				5					10		

ata	aaa	tcc	atc	aca	ggt	ggt	aaa	tac	tat	ggt	aat	ggt	ggt	agc	tgt	100
Ile	Lys	Ser	Ile	Thr	Gly	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	Ser	Cys	
			15				20					25				

aac	tct	cat	ggt	tgt	tca	gta	aat	tgg	ggg	caa	gca	tgg	act	tgt	ggg	148
Asn	Ser	His	Gly	Cys	Ser	Val	Asn	Trp	Gly	Gln	Ala	Trp	Thr	Cys	Gly	
			30				35					40				

gta	aat	cat	cta	gct	aat	ggc	ggt	cat	ggg	ggt	tgt	taa	ttatttaa	196
Val	Asn	His	Leu	Ala	Asn	Gly	Gly	His	Gly	Val	Cys			
			45			50				55				

<210> 2

<211> 55

<212> PRT

<213> Lactobacillus sake

<400> 2

Met	Lys	Asn	Thr	Arg	Ser	Leu	Thr	Ile	Gln	Glu	Ile	Lys	Ser	Ile	Thr
1				5					10				15		

Gly	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	Ser	Cys	Asn	Ser	His	Gly	Cys
			20				25					30			

Ser	Val	Asn	Trp	Gly	Gln	Ala	Trp	Thr	Cys	Gly	Val	Asn	His	Leu	Ala
			35				40					45			

Asn	Gly	Gly	His	Gly	Val	Cys
			50			55

```
<400> 5
ttaaaaaagg agacgtgatt aaa atg gca aac aaa gac aat att aaa act gaa 53
      Met Ala Asn Lys Asp Asn Ile Lys Thr Glu
            1             5             10
```


tct aaa aac aac atc gaa gct ctc ttg cac tta cta gaa aag cgt cct 101
 Ser Lys Asn Asn Ile Glu Ala Leu Leu His Leu Leu Glu Lys Arg Pro
 15 20 25

gta aaa tcc agt gaa tta ctc gat att att gac gtt ctt tcc caa gtt 149
 Val Lys Ser Ser Glu Leu Leu Asp Ile Ile Asp Val Leu Ser Gln Val
 30 35 40

tat agc aaa att gat ata gct aag aat ccc ga 181
 Tyr Ser Lys Ile Asp Ile Ala Lys Asn Pro
 45 50

<210> 6
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus sake

<400> 6
 Met Ala Asn Lys Asp Asn Ile Lys Thr Glu Ser Lys Asn Asn Ile Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu His Leu Leu Glu Lys Arg Pro Val Lys Ser Ser Glu Leu
 20 25 30

Leu Asp Ile Ile Asp Val Leu Ser Gln Val Tyr Ser Lys Ile Asp Ile
 35 40 45

Ala Lys Asn Pro
 50

<210> 7
 <211> 1203
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake

<220>
 <221> CDS
 <222> (20)..(1201)

<400> 7
 aaattaggag acttatata ttg ttt aat ctg ttg aga tac aaa aaa tta tat 52
 Leu Phe Asn Leu Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr
 1 5 10

tgt tca caa gtg gat gaa gat gat tgt gga atc gca gct ttg aat atg 100
 Cys Ser Gln Val Asp Glu Asp Asp Cys Gly Ile Ala Ala Leu Asn Met
 15 20 25

att ttt aaa aat ttt ggt tcc gaa tat tca cta tca aaa ttg cga ttc 148
 Ile Phe Lys Asn Phe Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Ser Lys Leu Arg Phe
 30 35 40

tta gca aaa acc aqt caa caa ggg act act att ttt gga ctg ata aag 196
 Leu Ala Lys Thr Ser Gln Gln Gly Thr Thr Ile Phe Gly Leu Ile Lys
 45 50 55

gct gca gag gaa cta aat tta gaa ggg aat gca tta caa gct gat atg 244

Ala	Ala	Glu	Glu	Leu	Asn	Leu	Glu	Ala	Asn	Ala	Leu	Gln	Ala	Asp	Met	
60					65					70					75	
ggc	atc	ttt	aaa	gat	gaa	aat	tta	atg	cta	cca	atc	att	gca	cat	gtt	292
Gly	Ile	Phe	Lys	Asp	Glu	Asn	Leu	Met	Leu	Pro	Ile	Ile	Ala	His	Val	
				80					85					90		
tta	aag	caa	gga	aaa	gtt	ctg	cat	tac	tac	gtt	gta	ttt	gat	gtt	tgc	340
Leu	Lys	Gln	Gly	Lys	Val	Leu	His	Tyr	Tyr	Val	Val	Phe	Asp	Val	Ser	
			95					100					105			
aaa	gac	ttt	tta	att	att	ggt	gac	cca	gac	cca	aca	ata	gga	att	acg	388
Lys	Asp	Phe	Leu	Ile	Ile	Gly	Asp	Pro	Asp	Pro	Thr	Ile	Gly	Ile	Thr	
		110					115					120				
gaa	atc	tcc	aaa	aag	gat	ttt	gaa	aat	gaa	tgg	acg	ggt	aat	ttc	ata	436
Glu	Ile	Ser	Lys	Lys	Asp	Phe	Glu	Asn	Glu	Trp	Thr	Gly	Asn	Phe	Ile	
		125				130				135						
aca	ttt	tca	aaa	gga	aag	aac	ttt	gtt	tca	gag	aag	cag	aga	aat	aac	484
Thr	Phe	Ser	Lys	Gly	Lys	Asn	Phe	Val	Ser	Glu	Lys	Gln	Arg	Asn	Asn	
140					145					150					155	
agt	tta	ctc	aag	ttt	att	cct	att	ttg	aga	cag	caa	aaa	tcc	cta	ata	532
Ser	Leu	Leu	Lys	Phe	Ile	Pro	Ile	Leu	Arg	Gln	Gln	Lys	Ser	Leu	Ile	
				160				165						170		
ttc	tgg	ata	gct	ttc	gcc	gca	ata	cta	ttg	atg	ata	att	agt	att	gca	580
Phe	Trp	Ile	Ala	Phe	Ala	Ala	Ile	Leu	Leu	Met	Ile	Ile	Ser	Ile	Ala	
			175				180						185			
gga	tca	ctt	ttt	tta	gaa	caa	ctt	gta	gat	ata	tat	ata	cca	cac	aaa	628
Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Glu	Gln	Leu	Val	Asp	Ile	Tyr	Ile	Pro	His	Lys	
		190					195					200				
aat	atg	gat	aca	ttg	ggg	att	atc	tgc	att	tgc	tta	att	gga	gcc	tat	676
Asn	Met	Asp	Thr	Leu	Gly	Ile	Ile	Ser	Ile	Cys	Leu	Ile	Gly	Ala	Tyr	
		205				210				215						
ctt	tta	cag	gcc	gta	atg	acg	tat	ttt	cag	aat	ttt	tta	cta	act	ata	724
Leu	Leu	Gln	Ala	Val	Met	Thr	Tyr	Phe	Gln	Asn	Phe	Leu	Leu	Thr	Ile	
220					225					230				235		
ttt	gga	caa	aat	ctt	tct	aga	aaa	att	att	tta	aat	tat	att	aat	cac	772
Phe	Gly	Gln	Asn	Leu	Ser	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu	Asn	Tyr	Ile	Asn	His	
			240					245						250		
ctt	ttt	gaa	tta	ccc	atg	tct	ttc	ttc	tca	aca	cgt	aga	gtt	ggc	gaa	820
Leu	Phe	Glu	Leu	Pro	Met	Ser	Phe	Phe	Ser	Thr	Arg	Arg	Val	Gly	Glu	
			255					260					265			
ata	gtc	tct	cgg	ttt	aca	gat	gca	agc	aag	att	ata	gat	gct	ttg	gca	868
Ile	Val	Ser	Arg	Phe	Thr	Asp	Ala	Ser	Lys	Ile	Ile	Asp	Ala	Leu	Ala	
			270				275					280				
agt	acg	att	ttg	act	ctc	ttt	tta	gat	gtt	tgg	atg	ttg	gtt	aca	atc	916
Ser	Thr	Ile	Leu	Thr	Leu	Phe	Leu	Asp	Val	Trp	Met	Leu	Val	Thr	Ile	
		285				290				295						
tca	atc	gtt	ctc	gta	ttt	tta	aat	aca	aag	tta	ttt	atg	att	tct	ctg	964
Ser	Ile	Val	Leu	Val	Phe	Leu	Asn	Thr	Lys	Leu	Phe	Met	Ile	Ser	Leu	

```

300          305          310          315
gta tct ata ccg gtg tac tca gtt ata att tat gcg ttt aaa aat aca 1012
Val Ser Ile Pro Val Tyr Ser Val Ile Ile Tyr Ala Phe Lys Asn Thr
          320          325          330

ttt aat ggc ctg aac cat aaa tca atg gaa aat gca gca tta ttg aat 1060
Phe Asn Gly Leu Asn His Lys Ser Met Glu Asn Ala Ala Leu Leu Asn
          335          340          345

tct gca ata atc gaa aac gta act ggc ata gaa act gta aaa tca tta 1108
Ser Ala Ile Ile Glu Asn Val Thr Gly Ile Glu Thr Val Lys Ser Leu
          350          355          360

act tca gaa gaa ttt tcc tac aat caa atc act gat aga ttc gaa aat 1156
Thr Ser Glu Glu Phe Ser Tyr Asn Gln Ile Thr Asp Arg Phe Glu Asn
          365          370          375

ttt ctt aac agt tcc tta cgg tat acg ata gct gac caa gga cag ca 1203
Phe Leu Asn Ser Ser Leu Arg Tyr Thr Ile Ala Asp Gln Gly Gln
          380          385          390

<210> 8
<211> 394
<212> PRT
<213> Lactobacillus sake

<400> 8
Leu Phe Asn Leu Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr Cys Ser Gln Val Asp
 1          5          10          15

Glu Asp Asp Cys Gly Ile Ala Ala Leu Asn Met Ile Phe Lys Asn Phe
          20          25          30

Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Ser Lys Leu Arg Phe Leu Ala Lys Thr Ser
          35          40          45

Gln Gln Gly Thr Thr Ile Phe Gly Leu Ile Lys Ala Ala Glu Glu Leu
          50          55          60

Asn Leu Glu Ala Asn Ala Leu Gln Ala Asp Met Gly Ile Phe Lys Asp
          65          70          75          80

Glu Asn Leu Met Leu Pro Ile Ile Ala His Val Leu Lys Gln Gly Lys
          85          90          95

Val Leu His Tyr Tyr Val Val Phe Asp Val Ser Lys Asp Phe Leu Ile
          100          105          110

Ile Gly Asp Pro Asp Pro Thr Ile Gly Ile Thr Glu Ile Ser Lys Lys
          115          120          125

Asp Phe Glu Asn Glu Trp Thr Gly Asn Phe Ile Thr Phe Ser Lys Gly
          130          135          140

Lys Asn Phe Val Ser Glu Lys Gln Arg Asn Asn Ser Leu Leu Lys Phe
          145          150          155          160

Ile Pro Ile Leu Arg Gln Gln Lys Ser Leu Ile Phe Trp Ile Ala Phe
          165          170          175

```

Ala Ala Ile Leu Leu Met Ile Ile Ser Ile Ala Gly Ser Leu Phe Leu
 180 185 190

Glu Gln Leu Val Asp Ile Tyr Ile Pro His Lys Asn Met Asp Thr Leu
 195 200 205

Gly Ile Ile Ser Ile Cys Leu Ile Gly Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Val
 210 215 220

Met Thr Tyr Phe Gln Asn Phe Leu Leu Thr Ile Phe Gly Gln Asn Leu
 225 230 235 240

Ser Arg Lys Ile Ile Leu Asn Tyr Ile Asn His Leu Phe Glu Leu Pro
 245 250 255

Met Ser Phe Phe Ser Thr Arg Arg Val Gly Glu Ile Val Ser Arg Phe
 260 265 270

Thr Asp Ala Ser Lys Ile Ile Asp Ala Leu Ala Ser Thr Ile Leu Thr
 275 280 285

Leu Phe Leu Asp Val Trp Met Leu Val Thr Ile Ser Ile Val Leu Val
 290 295 300

Phe Leu Asn Thr Lys Leu Phe Met Ile Ser Leu Val Ser Ile Pro Val
 305 310 315 320

Tyr Ser Val Ile Ile Tyr Ala Phe Lys Asn Thr Phe Asn Gly Leu Asn
 325 330 335

His Lys Ser Met Glu Asn Ala Ala Leu Leu Asn Ser Ala Ile Ile Glu
 340 345 350

Asn Val Thr Gly Ile Glu Thr Val Lys Ser Leu Thr Ser Glu Glu Phe
 355 360 365

Ser Tyr Asn Gln Ile Thr Asp Arg Phe Glu Asn Phe Leu Asn Ser Ser
 370 375 380

Leu Arg Tyr Thr Ile Ala Asp Gln Gly Gln
 385 390

<210> 9

<211> 2042

<212> ADN

<213> Lactobacillus sake

<400> 9

agcttcggga ttcttagcta tatcaatttt gctataaaact tgggaaagaa cgtcaataat 60
 atcgagtaat tcaactggatt ttacaggacg cttttctagt aagtgcaga gagcttcgat 120
 gttgttttta gattcagttt taatattgtc ttgtttgccc attttaatca cgtctccttt 180
 tttatagtaa taaaaaaaaa acaattaaat tagtgctttt ttatctggta attaacaaac 240
 tccatgaccg ccattagcta gatggtttac tcacaagtc catgcttgcc cccaatttac 300
 tgaacagccg tgagagttac agctaacgcc attaccatag tatttaccac ctgtaataga 360
 tttcatttct tgaattgta ggctttttgc gtttttcata aagaacatct ccaaattata 420
 ttttttagtg attcttgaag ttctgttgta acgcagaatt ttggaagaat gagtacttgt 480
 tagaaatttg ccgattttaa taattaacaa accccatgac cgccattagc tagatgattt 540
 accccaaag tccatgcttg cccccaattt aotgaacaa catgagagtt acagotaaca 600

```

ccattacat agtatttacc acctgtgatg gattttattt cttggatcgt taagctacgt 660
gtattcttca ttttgaatac ctctgttaa ataattttta cagatcagt gtagttctaa 720
tgtgaaattg tgtcaagttt agcaaatata tattttaggg atggaaaaac ttgcttttaa 780
ttcgacttga ctataacggg ataatactgg tattactata ttgttttagc ttcacaaaaa 840
aattaggaga cttatatatt gttaaatctg ttgagataga aaaaattata ttgttcacaa 900
gtggatgaag atgattgtgg aatcgacagt ttgaatatga tttttaaaaa ttttggttcc 960
gaatattcac tatcaaaatt gcgattctta gcaaaaacca gtcaacaagg gactactatt 1020
tttggaactga taaaggctgc agaggaacta aatttagaag cgaatgcatt acaagctgat 1080
atgggcatct ttaaagatga aaatttaatg ctaccaatca ttgcacatgt tttaaagcaa 1140
ggaaaagttc tgcattacta cgttgtattt gatgtttcga aagacttttt aattattggt 1200
gacccagacc caacaatagg aattacggaa atctccaaaa aggattttga aaatgaatgg 1260
acgggtaatt tcataacatt ttcaaaagga aagaactttg tttcagagaa gaagagaaat 1320
aacagtttac tcaagtttat tctatttttg agacagcaaa aatccctaatt attctggata 1380
gctttcgccg caatactatt gatgataatt agtattgcag gatcactttt tttagaacaa 1420
ctttagata tatatatacc acacaaaaat atggatacat tggggattat ctcgatttgc 1500
ttaattggag cctatctttt acaggccgta atgaaglatt ttcagaattt tttactaact 1560
atatttggac aaaatctttc tagaaaaatt attttaaatt atattaatca cctttttgaa 1620
ttacccatgt ctttcttctc aacacgtaga gttggcgaaa tagtctctcg gtttacagat 1680
gcaagcaaga ttatagatgc tttggcaagt acgattttga ctctcttttt agatgtttgg 1740
atgttggtta caatctcaat cgttctcgta tttttaata caaagttatt tatgatttct 1800
ctggtatcta taccggtgta ctcagttata atttatgcgt ttaaaaaaac atttaatggc 1860
ctgaaccata aatcaatgga aaatgcagca ttattgaatt ctgcaataat cgaaaacgta 1920
actggcatag aaactgtaaa atcattaact tcagaagaat tttctacaa tcaaatcact 1980
gatagattcg aaaattttct taacagttcc ttacggtata cgatagctga ccaaggacag 2040
ca
2042

```

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake

<400> 10
 aartattatg gnaaygngt 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake

<400> 11
 acatgatgnc cncrtrtngc 20

<210> 12
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus sake

<400> 12
 Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys Asn Ser His Gly Cys Ser Val
 1 5 10 15
 Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly Val Asn His Leu Ala Asn Gly
 20 25 30
 Gly His Gly Val Cys
 35

<400> 13

8

aat atg gat aca ttg ggg att atc tcg att tgc tta att gga gcc tat 676
 Asn Met Asp Thr Leu Gly Ile Ile Ser Ile Cys Leu Ile Gly Ala Tyr
 205 210 215

ctt tta cag gcc gta atg acg tat ttt cag aat ttt tta cta act ata 724
 Leu Leu Gln Ala Val Met Thr Tyr Phe Gln Asn Phe Leu Leu Thr Ile
 220 225 230 235

ttt gga caa aat ctt tct aga aaa att att tta aat tat att aat cac 772
 Phe Gly Gln Asn Leu Ser Arg Lys Ile Ile Leu Asn Tyr Ile Asn His
 240 245 250

ctt ttt gaa tta ccc atg tct ttc ttc tca aca cgt aga gtt ggc gaa 820
 Leu Phe Glu Leu Pro Met Ser Phe Phe Ser Thr Arg Arg Val Gly Glu
 255 260 265

ata gtc tct cgg ttt aca gat gca agc aag att ata gat gct ttg gca 868
 Ile Val Ser Arg Phe Thr Asp Ala Ser Lys Ile Ile Asp Ala Leu Ala
 270 275 280

agt acg att ttg act ctc ttt tta gat gtt tgg atg ttg gtt aca atc 916
 Ser Thr Ile Leu Thr Leu Phe Leu Asp Val Trp Met Leu Val Thr Ile
 285 290 295

tca atc gtt ctc gta ttt tta aat aca aag tta ttt atg att tct ctg 964
 Ser Ile Val Leu Val Phe Leu Asn Thr Lys Leu Phe Met Ile Ser Leu
 300 305 310 315

gta tct ata ccg gtg tac tca gtt ata att tat gcg ttt aaa aat aca 1012
 Val Ser Ile Pro Val Tyr Ser Val Ile Ile Tyr Ala Phe Lys Asn Thr
 320 325 330

ttt aat ggc ctg aac cat aaa tca atg gaa aat gca gca tta ttg aat 1060
 Phe Asn Gly Leu Asn His Lys Ser Met Glu Asn Ala Ala Leu Leu Asn
 335 340 345

tct gca ata atc gaa aac gta act ggc ata gaa act gta aaa tca tta 1108
 Ser Ala Ile Ile Glu Asn Val Thr Gly Ile Glu Thr Val Lys Ser Leu
 350 355 360

act tca gaa gaa ttt tcc tac aat caa atc act gat aga ttc gaa aat 1156
 Thr Ser Glu Glu Phe Ser Tyr Asn Gln Ile Thr Asp Arg Phe Glu Asn
 365 370 375

ttt ctt aac agt tcc tta cgg tat acg ata gct gac caa gga cag caa 1204
 Phe Leu Asn Ser Ser Leu Arg Tyr Thr Ile Ala Asp Gln Gly Gln Gln
 380 385 390 395

got tta aaa gtg ggt ttg aag cta att ctt ata gtc ttt atc tta tgg 1252
 Ala Leu Lys Val Gly Leu Lys Leu Ile Leu Ile Val Phe Ile Leu Trp
 400 405 410

gct gga gca atc caa gtt atg agg ggg aat ctc aca gtc gga aga tta 1300
 Ala Gly Ala Ile Gln Val Met Arg Gly Asn Leu Thr Val Gly Arg Leu
 415 420 425

ttg gct ttt aat gct tta gta aca tac ttt tta aat ccc tta gag aat 1348
 Leu Ala Phe Asn Ala Leu Val Thr Tyr Phe Leu Asn Pro Leu Glu Asn
 430 435 440

att att aat tta caa cca aag cta caa act gca aga gtc gct aat att	1396
Ile Ile Asn Leu Gln Pro Lys Leu Gln Thr Ala Arg Val Ala Asn Ile	
445 450 455	
aga cta aat gaa gta tta tta gtg gat tct gag ttt aat agg ggg gga	1444
Arg Leu Asn Glu Val Leu Leu Val Asp Ser Glu Phe Asn Arg Gly Gly	
460 465 470 475	
cgc gac agc tca aca aac tta aat ggg gat atc gta ttt caa gat gta	1492
Arg Asp Ser Ser Thr Asn Leu Asn Gly Asp Ile Val Phe Gln Asp Val	
480 485 490	
gaa ttt agt tat ggt tac gga tcg aac gta ttg cac aac atc aat ata	1540
Glu Phe Ser Tyr Gly Tyr Gly Ser Asn Val Leu His Asn Ile Asn Ile	
495 500 505	
aaa ata caa aag aat agt agt aca acg att gtt ggt atg agc ggt tct	1588
Lys Ile Gln Lys Asn Ser Ser Thr Thr Ile Val Gly Met Ser Gly Ser	
510 515 520	
ggg aaa tcc aca tta gca aaa tta atg gtt ggt ttc tat caa gcc gga	1636
Gly Lys Ser Thr Leu Ala Lys Leu Met Val Gly Phe Tyr Gln Ala Gly	
525 530 535	
tca gga caa ata tta tta aat ggt aaa tta atc gat aac att gat cgt	1684
Ser Gly Gln Ile Leu Leu Asn Gly Lys Leu Ile Asp Asn Ile Asp Arg	
540 545 550 555	
cat gcc ctg aga caa tcg att acg tat gta cca cag gaa ccg gta atg	1732
His Ala Leu Arg Gln Ser Ile Thr Tyr Val Pro Gln Glu Pro Val Met	
560 565 570	
ttc gca ggt aca att tta gaa aat ctt att atg cag aat aaa aga aat	1780
Phe Ala Gly Thr Ile Leu Glu Asn Leu Ile Met Gln Asn Lys Arg Asn	
575 580 585	
tta tct att gat aaa gtg aaa gag gca tgt agg ata gcc gaa att gat	1828
Leu Ser Ile Asp Lys Val Lys Glu Ala Cys Arg Ile Ala Glu Ile Asp	
590 595 600	
aaa gat ata gaa aat ttt cct atg ggg tat gat aca gat att tcc gaa	1876
Lys Asp Ile Glu Asn Phe Pro Met Gly Tyr Asp Thr Asp Ile Ser Glu	
605 610 615	
cat ggg agt tca atc tca gta ggt caa aaa caa aga ctt tct att gca	1924
His Gly Ser Ser Ile Ser Val Gly Gln Lys Gln Arg Leu Ser Ile Ala	
620 625 630 635	
aga tca ctg ctg aca gag tct aat gtt tta ctg ttt gat gaa tca acc	1972
Arg Ser Leu Leu Thr Glu Ser Asn Val Leu Leu Phe Asp Glu Ser Thr	
640 645 650	
agt agt ttg gac act att act gag cag cga ata att gaa aac ota ttg	2020
Ser Ser Leu Asp Thr Ile Thr Glu Gln Arg Ile Ile Glu Asn Leu Leu	
655 660 665	
aat tta aat gac aac aca tta ata ttc gtt gca cat cga ttg tca gtt	2068
Asn Leu Asn Asp Lys Thr Leu Ile Phe Val Ala His Arg Leu Ser Val	
670 675 680	

gct aag caa act gaa aat att atc gtt atg gat cac ggt gga att gtt 2116
 Ala Lys Gln Thr Glu Asn Ile Ile Val Met Asp His Gly Gly Ile Val
 685 690 695

gaa aca ggt tcg cat gat aaa tta ata ttg gaa aat gga tat tat aaa 2164
 Glu Thr Gly Ser His Asp Lys Leu Ile Leu Glu Asn Gly Tyr Tyr Lys
 700 705 710 715

gaa tta tgt act gtg aag acg aag aaa aaa gaa ttt tagataaaac aaaa 2214
 Glu Leu Cys Thr Val Lys Thr Lys Lys Lys Glu Phe
 720 725

<210> 14
 <211> 727
 <212> PRT
 <213> lactobacillus sake

<400> 14
 Leu Phe Asn Leu Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr Cys Ser Gln Val Asp
 1 5 10 15

Glu Asp Asp Cys Gly Ile Ala Ala Leu Asn Met Ile Phe Lys Asn Phe
 20 25 30

Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Ser Lys Leu Arg Phe Leu Ala Lys Thr Ser
 35 40 45

Gln Gln Gly Thr Thr Ile Phe Gly Leu Ile Lys Ala Ala Glu Glu Leu
 50 55 60

Asn Leu Glu Ala Asn Ala Leu Gln Ala Asp Met Gly Ile Phe Lys Asp
 65 70 75 80

Glu Asn Leu Met Leu Pro Ile Ile Ala His Val Leu Lys Gln Gly Lys
 85 90 95

Val Leu His Tyr Tyr Val Val Phe Asp Val Ser Lys Asp Phe Leu Ile
 100 105 110

Ile Gly Asp Pro Asp Pro Thr Ile Gly Ile Thr Glu Ile Ser Lys Lys
 115 120 125

Asp Phe Glu Asn Glu Trp Thr Gly Asn Phe Ile Thr Phe Ser Lys Gly
 130 135 140

Lys Asn Phe Val Ser Glu Lys Gln Arg Asn Asn Ser Leu Leu Lys Phe
 145 150 155 160

Ile Pro Ile Leu Arg Gln Gln Lys Ser Leu Ile Phe Trp Ile Ala Phe
 165 170 175

Ala Ala Ile Leu Leu Met Ile Ile Ser Ile Ala Gly Ser Leu Phe Leu
 180 185 190

Glu Gln Leu Val Asp Ile Tyr Ile Pro His Lys Asn Met Asp Thr Leu
 195 200 205

Gly Ile Ile Ser Ile Cys Leu Ile Gly Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Val
 210 215 220

Met Thr Tyr Phe Gln Asn Phe Leu Leu Thr Ile Phe Gly Gln Asn Leu
 225 230 235 240
 Ser Arg Lys Ile Ile Leu Asn Tyr Ile Asn His Leu Phe Glu Leu Pro
 245 250 255
 Met Ser Phe Phe Ser Thr Arg Arg Val Gly Glu Ile Val Ser Arg Phe
 260 265 270
 Thr Asp Ala Ser Lys Ile Ile Asp Ala Leu Ala Ser Thr Ile Leu Thr
 275 280 285
 Leu Phe Leu Asp Val Trp Met Leu Val Thr Ile Ser Ile Val Leu Val
 290 295 300
 Phe Leu Asn Thr Lys Leu Phe Met Ile Ser Leu Val Ser Ile Pro Val
 305 310 315 320
 Tyr Ser Val Ile Ile Tyr Ala Phe Lys Asn Thr Phe Asn Gly Leu Asn
 325 330 335
 His Lys Ser Met Glu Asn Ala Ala Leu Leu Asn Ser Ala Ile Ile Glu
 340 345 350
 Asn Val Thr Gly Ile Glu Thr Val Lys Ser Leu Thr Ser Glu Glu Phe
 355 360 365
 Ser Tyr Asn Gln Ile Thr Asp Arg Phe Glu Asn Phe Leu Asn Ser Ser
 370 375 380
 Leu Arg Tyr Thr Ile Ala Asp Gln Gly Gln Gln Ala Leu Lys Val Gly
 385 390 395 400
 Leu Lys Leu Ile Leu Ile Val Phe Ile Leu Trp Ala Gly Ala Ile Gln
 405 410 415
 Val Met Arg Gly Asn Leu Thr Val Gly Arg Leu Leu Ala Phe Asn Ala
 420 425 430
 Leu Val Thr Tyr Phe Leu Asn Pro Leu Glu Asn Ile Ile Asn Leu Gln
 435 440 445
 Pro Lys Leu Gln Thr Ala Arg Val Ala Asn Ile Arg Leu Asn Glu Val
 450 455 460
 Leu Leu Val Asp Ser Glu Phe Asn Arg Gly Gly Arg Asp Ser Ser Thr
 465 470 475 480
 Asn Leu Asn Gly Asp Ile Val Phe Gln Asp Val Glu Phe Ser Tyr Gly
 485 490 495
 Tyr Gly Ser Asn Val Leu His Asn Ile Asn Ile Lys Ile Gln Lys Asn
 500 505 510
 Ser Ser Thr Thr Ile Val Gly Met Ser Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu
 515 520 525
 Ala Lys Leu Met Val Gly Phe Tyr Gln Ala Gly Ser Gly Gln Ile Leu
 530 535 540

Leu Asn Gly Lys Leu Ile Asp Asn Ile Asp Arg His Ala Leu Arg Gln
 545 550 555 560
 Ser Ile Thr Tyr Val Pro Gln Glu Pro Val Met Phe Ala Gly Thr Ile
 565 570 575
 Leu Glu Asn Leu Ile Met Gln Asn Lys Arg Asn Leu Ser Ile Asp Lys
 580 585 590
 Val Lys Glu Ala Cys Arg Ile Ala Glu Ile Asp Lys Asp Ile Glu Asn
 595 600 605
 Phe Pro Met Gly Tyr Asp Thr Asp Ile Ser Glu His Gly Ser Ser Ile
 610 615 620
 Ser Val Gly Gln Lys Gln Arg Leu Ser Ile Ala Arg Ser Leu Leu Thr
 625 630 635 640
 Glu Ser Asn Val Leu Leu Phe Asp Glu Ser Thr Ser Ser Leu Asp Thr
 645 650 655
 Ile Thr Glu Gln Arg Ile Ile Glu Asn Leu Leu Asn Leu Asn Asp Lys
 660 665 670
 Thr Leu Ile Phe Val Ala His Arg Leu Ser Val Ala Lys Gln Thr Glu
 675 680 685
 Asn Ile Ile Val Met Asp His Gly Gly Ile Val Glu Thr Gly Ser His
 690 695 700
 Asp Lys Leu Ile Leu Glu Asn Gly Tyr Tyr Lys Glu Leu Cys Thr Val
 705 710 715 720
 Lys Thr Lys Lys Lys Glu Phe
 725

<210> 15
 <211> 3055
 <212> ADN
 <213> lactobacillus sake

<400> 15
 agcttcggga ttcttagcta tatcaatttt gctataaact tgggaaagaa cgtcaataat 60
 atcgagtaat tcactggatt ttacaggacg cttttctagt aagtgaaga gagcttcgat 120
 gttgttttta gattcagttt taatattgtc ttgttttgcc attttaatca cgtctccttt 180
 tttatagtaa taaaaaaaac acaattaaat tagtgctttt ttatctggta attaacaaac 240
 tccatgaccg ccattagcta gatggtttac tccacaagtc catgcttgcc cccaatttac 300
 tgaacagccg tgagagttac agetaacgoc attaacatag tattaccac ctgtaataga 360
 tttcatttct tgaattgtta ggctttttgc gtttttcata aagaacatct ccaaattata 420
 ttttttagtg attcttgaag ttctgttgta acgcagaatt ttggaagaat gactacttgt 480
 tagaaatttg ccgatttaaa taattaacaa accccatgac cgccattagc tagatgattt 540
 accccacaag tccatgcttg cccccaattt actgaacaac catgagagtt acagctaaca 600
 ccattaccat agtatattac acctgtgatg gattttattt cttggatcgt taagctacgt 660
 gtattcttca ttttgaatac ctctgtttaa ataattttta cactgacgt gtagttctaa 720
 tgtgaaattg tgtcaagttt agcaaatata ttttttaggc atggaaaaac ttgcttttaa 780
 ttcgacttga ctataacggt ataatactgg tattactata ttgttttagc ttcacaaaaa 840
 aattaggaga cttatatatt gttaactctg ttgagataca aaaaattata ttgttcacaa 900
 gtggatgaag atgattgtgg aatcgacgt ttgaatatga tttttaaaaa ttttggttcc 960
 gaatattcac tatcaaaatt gcgattctta gcaaaaacca qtcaacaagg gactactatt 1020

```

tttggactga taaaggctgc agagggaacta aatttagaag cgaatgcatt acaagctgat 1080
atgggcatct ttaaagatga aaatttaatg ctaccaatca ttgcacatgt tttaaagcaa 1140
ggaaaagtgc tgcattacta cgttgtatct gatgtttcga aagacttttt aattatttgt 1200
gacccagacc caacaatagg aattacggaa atctccaaaa aggattttga aaatgaatgg 1260
acgggtaatt tcataacatt ttcaaaagga aagaactttg tttcagagaa gcagagaaat 1320
aacagttttac tcaagttttat tcctattttg agacagcaaa aatccctaata attctggata 1380
gctttcgccg caatactatt gatgataatt agtattgcag gatcactttt tttagaacaa 1440
cttgtagata tatatatacc acacaaaaat atggatacat tggggattat ctcgatttgc 1500
ttaattggag cctatctttt acaggccgta atgacgtatt ttcagaatct tttactaact 1560
atatttggac aaaatctttc tagaaaaatt attttaaatt atattaatca cctttttgaa 1620
ttacccatgt ctttcttctc aacacgtaga gttggcgaaa tagtctctcg gtttacagat 1680
gcaagcaaga ttatagatgc tttggcaagt acgattttga ctctottttt agatgttttg 1740
atgttggtta caatctcaat cgttctcgtt tttttaaata caaagttatt tatgatttct 1800
ctggatatcta taccgggtga ctacgttata atttatgcgt ttaaaaatac atttaattggc 1860
ctgaaccata aaatcaatgga aaatgcagca ttattgaatt ctgcaataat cgaaaacgta 1920
actggcatag aaactgtaaa atcatttaact tcagaagaat tttcctacaa tcaaatcaact 1980
gatagattcg aaaattttct taacagttcc ttacggtata cgatagctga ccaaggacag 2040
caagctttta aagtgggttt gaagctaatt cttatagctt ttatcttatg ggctggagca 2100
atccaagtta tgagggggaa tctcacagtc ggaagattat tggcttttaa tgcttttagt 2160
acatactttt taaatccctt agagaatatt attaatctac aaccaaaagt acaaactgca 2220
agagtgccta atattagact aaatgaagta ttattagtgg attctgagtt taataggggg 2280
ggacgcgaca gctcaacaaa cttaaatggg gatatcgat ttcaagatgt agaatttagt 2340
tatggttacg gatcgaaact attgcacaaa atcaatataa aaatacaaaa gaatagtagt 2400
acaacgattg ttggtatgag cggttctggg aaatccacat tagcaaaaatt aatggttggt 2460
ttctatcaag ccggtatcagg acaaatatta ttaaatggta aattaatcga taacattgat 2520
cgtcatgccc tgagacaatc gattacgtat gtaccacagg aaccggtaat gttcgcaggt 2580
acaattttag aaaatcttat tatgcagaat aaaagaaatt tatctattga taaagtgaat 2640
gaggcatgta ggatagccga aattgataaa gatatagaaa attttcctat ggggtatgat 2700
acagatattt ccgaacatgg gagttcaatc tcagtaggtc aaaaacaaag actttctatt 2760
gcaagatcac tgctgacaga gtctaattgt ttactgtttg atgaatcaac cagttagttg 2820
gacactatta ctgagcagcg aataattgaa aacctattga atttaaatga caaacatta 2880
atattcgttg cactcagatt gtcagttgct aagcaaaactg aaaatattat cgttatggat 2940
cacggtggaa ttgttgaaac aggttcgcat gataaattaa tattggaaaa tggatattat 3000
aaagaattat gtactgtgaa gacgaagaaa aaagaatttt agataaaaca aaac 3055

```

<210> 16
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> lactobacillus sake

<400> 16
 ccttggtcag gctatcg 17

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> lactobacillus sake

<400> 17
 atcacctttt tgaattaccc 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/01642

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/31 C07K14/335 A23L3/3463 A23L3/3571		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A23L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUGAS M ET AL: "Application of the bacteriocinogenic <i>Lactobacillus sakei</i> CTC494 to prevent growth of <i>Listeria</i> in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres" FOOD MICROBIOL., vol. 15, 1998, pages 639-650, XP000982835 ISSN: 0021-8847 page 640, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 3 --- -/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>"A" document outlining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search 31 July 2001		Date of mailing of the international search report 07/08/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mata Vicente, T.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/01642

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>AXELSSON L ET AL: "THE GENES INVOLVED IN PRODUCTION OF AND IMMUNITY TO SAKACIN A, A BACTERIOCIN FROM LACTOBACILLUS SAKE LB706" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, US, WASHINGTON, DC, vol. 177, no. 8, 1 April 1995 (1995-04-01), pages 2125-2137, XP000673873 ISSN: 0021-9193 abstract page 2125, column 1, paragraph 1 page 2125, column 2, paragraph 2 page 2136, column 2, paragraph 2</p>	1-12
A	<p>HUEHNE KATHRIN ET AL: "Analysis of the sakacin P gene cluster from Lactobacillus sake Lb674 and its expression in sakacin-negative Lb. sake strains." MICROBIOLOGY (READING), vol. 142, no. 6, 1996, pages 1437-1448, XP000982832 ISSN: 1350-0872 page 1437, column 1 -column 2, paragraph 1 page 1438, column 2, paragraph 1 page 1445, column 2, paragraph 2 page 1447, column 1, paragraph 3</p>	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/01642

A. PLACEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/31 C07K14/335 A23L3/3463 A23L3/3571		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N C07K A23L		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HUGAS M ET AL: "Application of the bacteriocinogenic Lactobacillus sakei CTC494 to prevent growth of Listeria in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres" FOOD MICROBIOL., vol. 15, 1998, pages 639-650, XP000982835 ISSN: 0021-8847 page 640, colonne 1, alinéa 3 -colonne 2, alinéa 3 <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">-/-</div>	1-12
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
31 juillet 2001		07/08/2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3018		Mata Vicente, T.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 01/01642

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>AXELSSON L ET AL: "THE GENES INVOLVED IN PRODUCTION OF AND IMMUNITY TO SAKACIN A, A BACTERIOCIN FROM LACTOBACILLUS SAKE LB706" JOURNAL OF BACTERIOLOGY.US.WASHINGTON, DC, vol. 177, no. 8, 1 avril 1995 (1995-04-01), pages 2125-2137, XP000673873 ISSN: 0021-9193 abrégé page 2125, colonne 1, alinéa 1 page 2125, colonne 2, alinéa 2 page 2136, colonne 2, alinéa 2</p>	1-12
A	<p>HUEHNE KATHRIN ET AL: "Analysis of the sakacin P gene cluster from Lactobacillus sake Lb674 and its expression in sakacin-negative Lb. sake strains." MICROBIOLOGY (READING), vol. 142, no. 6, 1996, pages 1437-1448, XP000982832 ISSN: 1350-0872 page 1437, colonne 1 -colonne 2, alinéa 1 page 1438, colonne 2, alinéa 1 page 1445, colonne 2, alinéa 2 page 1447, colonne 1, alinéa 3</p>	1-12